

The 43rd Scientific Meeting of
the Japanese Medical Society for
Lung Surfactant and Biological Interface

日本 肺サーファクタントおよび界面現象に関する学術集会
**肺サーファクタント
界面医学会** (旧 日本界面医学会)
第43回学術研究会



2007年 **10月13日** 土

札幌医科大学記念ホール

札幌市中央区南1条西18丁目

会 長 ■ **高橋 弘毅** 札幌医科大学医学部内科学第三講座



開催のご挨拶

札幌医科大学医学部内科学第三講座

高橋 弘毅

日本肺サーファクタント・界面医学会第43回学術研究会を平成19年10月13日(土)に札幌医科大学記念ホールで開催させていただくことになりました。会長の大任を仰せつかり誠に光栄に存じます。

今回は、日本界面医学会から名称が変更されて初めての学術研究会となります。新しい名称によって、本学会が肺サーファクタントを研究のメインとする団体であることが理解されやすくなったのではと思います。

1975年に第1回の学術研究会が開催されて以来、肺サーファクタント学は人工サーファクタントの開発をはじめとし、様々な領域へ研究が拡大・発展してまいりました。その成果のひとつは免疫学への進出です。4種類ある特異蛋白質のなかで、サーファクタント蛋白質(SP)-A と SP-D がコレクチンと呼ばれるファミリーに属し、肺の自然免疫機構に重要な役割を果たしていることが明らかになりました。今回の特別講演において、この分野の第一人者である札幌医科大学医学部生化学第一講座 黒木由夫先生に「肺コレクチン(SP-A・SP-D)」による自然免疫の分子機構」と題して、最新の知見を含むレクチャーをお願いしております。また、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染免疫学講座の迎 寛先生には「デフェンシンと肺の感染制御、炎症、線維化」と題し、デフェンシンについて抗菌作用を超えた様々な機能の解説をしていただく予定です。

デフェンシンの産生細胞と分子構造はサーファクタント成分とは全く異なりますが、肺コレクチンと同様に気道での感染防御に関与する重要なペプチドであり、SP との関係についても触れていただけるものと思います。また、教育講演を東京大学生産技術研究所基礎系部門の酒井啓司先生にお願いしました。「分子物理

からみた界面計測」と題して、酒井先生が考案された流体粘弾性・表面張力測定のプローブをご紹介いただき、参加者の皆様と医療への応用の可能性を探っていきたいと考えております。

会場は札幌の都心にありながら、山々が近くに望まれ、一足早い紅葉を楽しんでいただけるものと存じます。また、本学会が実りある学会になりますように、多くの方にご参加いただき、明日からの研究・診療に役立てていただけることを心より希望いたします。

平成19年10月吉日

演者の方へのお願い

- 1) 一般演題の講演時間は12分、討論時間は3分です。必ずお守り下さい。

- 2) 発表はPCプレゼンテーションのみで行います。
 - 今回はパソコン(一面投影)による発表のみとさせていただきます。
 - OHP および35mmスライドプロジェクターは準備いたしませんので、ご注意ください。
 - PC環境は、OS:Windows XP、Application:Microsoft PowerPoint で対応いたします。
 - Macintosh の場合はPC持参による発表となります。なお、ACアダプターと外部出力に特殊なコネクターが必要な場合コネクターも併せてご持参下さい。
 - 発表データは上記PC環境で再生可能なファイルを作成して下さい。使用フォントはWindowsに標準で装備されているもの(MS明朝、MSゴシック、Times New Roman、Arial、Century等)を使用して下さい。
 - 発表ファイル名は、「演題番号-演者名.ppt」として下さい。(例:札幌花子.ppt)
 - 発表データはUSBメモリまたはCD-Rで準備し、学会の始まる前までに会場入口「発表受付」までお持ち下さい。これら以外のメディアは受付出来ませんのでご注意ください。USBメモリ、CD-Rはその場で返却いたします。なお、発表ファイルは学会終了後に消去いたします。
 - 発表の際は、演台にセットされている、モニター、キーボード、マウスを使用し、演者の先生ご自身で操作願います。

役員会(理事会・評議員会)・会長招宴・懇親会のご案内

1)役員会(理事会・評議員会同時開催)：

日 時：平成19年10月12日(金) 15:30～18:00

場 所：札幌プリンスホテル国際館パミール3階「風連の間」

札幌市中央区南2条西11丁目

TEL：011-241-1111

2)会長招宴：

日 時：平成19年10月12日(金) 18:00～

場 所：札幌プリンスホテル国際館パミール3階「屈斜路の間」

札幌市中央区南2条西11丁目

TEL：011-241-1111

3)懇親会：

日 時：平成19年10月13日(土) 17:30～

場 所：札幌プリンスホテルタワー1階「HAPUNA」

会費：500円

(学会受付の時に出席を確認させていただきます。)

会場周辺図

交通手段

札幌医科大学記念ホール

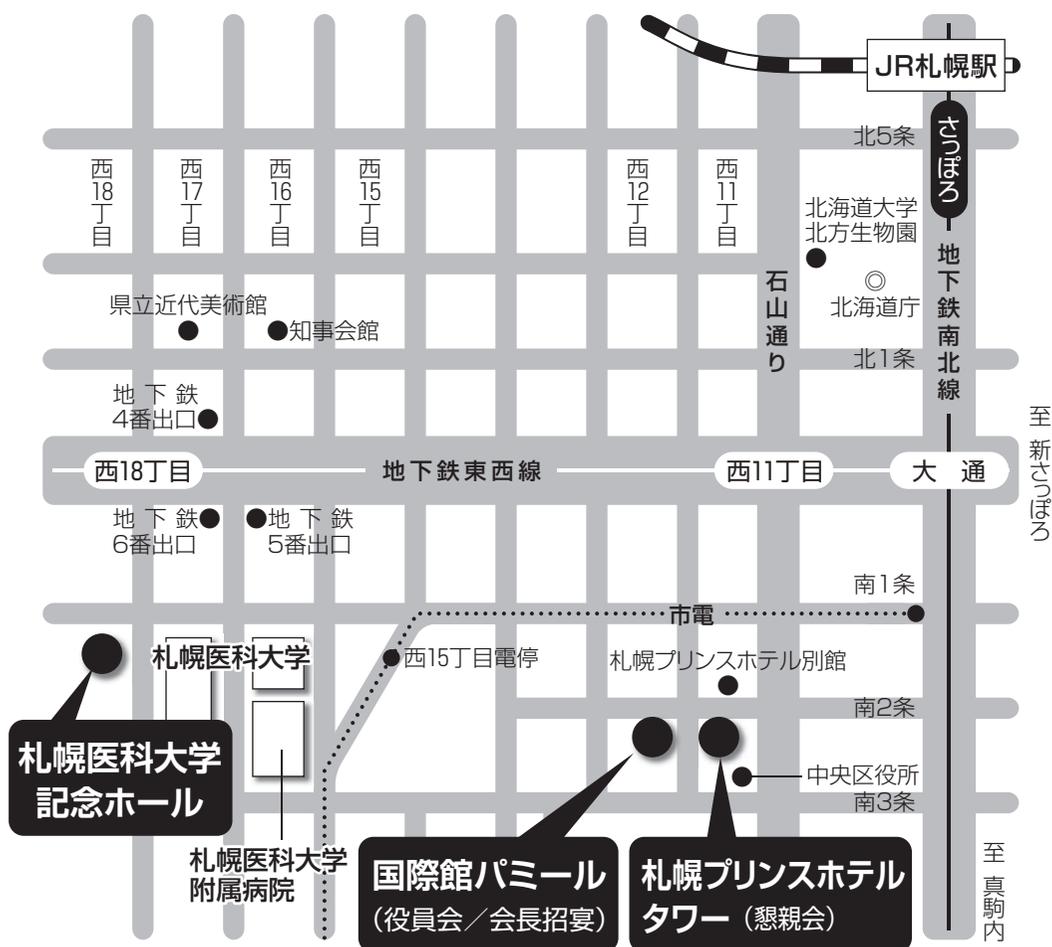
タクシー：JR 札幌駅から乗車 10分

地下鉄：南北線「さっぽろ」駅(JR 札幌駅直結)から「真駒内」行に乗車、
「大通」駅で東西線「宮の沢」行に乗換え「西18丁目」駅で下車、徒歩5分

札幌プリンスホテルタワー・国際館パミール

タクシー：JR 札幌駅から乗車 5分

地下鉄：「東西線西11丁目駅」2番出口から徒歩2分



プログラム

10:00～10:05

開会の挨拶

第43回肺サーファクタント・界面医学会学術研究会会長 高橋弘毅(札幌医科大学)

10:05～10:35

一般演題1

座長：白鳥正典(札幌医科大学)

01 ウランの代わりにウーロン茶抽出物(OTE)を用いた電子染色法 —II型肺胞上皮細胞の観察

○佐藤 茂、安達彰子、佐佐木喜広

日本医科大学 中央電子顕微鏡研究施設

02 肺魚気道および肺胞上細胞の形態学的研究

○松村豪一¹⁾、椎橋孝太郎¹⁾、森元貴子¹⁾、佐藤 茂²⁾、永田元春³⁾、
高橋常男⁴⁾、上田真太郎⁵⁾

聖学院大学人間福祉学部¹⁾、日本医科大学中央電子顕微鏡研究施設²⁾、
サンショウウオ研究所³⁾、神奈川歯科大学口腔解剖学⁴⁾、
上田老人医学研究所⁵⁾

10:35～11:05

一般演題2

座長：長 和俊(北海道大学)

03 *Rab38* 欠損ラット由来初代培養肺胞II型上皮細胞における フォスファチジルコリンの分泌活性

○長内和弘¹⁾、小林 誠¹⁾、八田理恵子¹⁾、三輪知子¹⁾、土原一真¹⁾、
井口晶晴¹⁾、黄正寿¹⁾、梶博久¹⁾、樋口純子²⁾

金沢医科大学呼吸機能治療学(呼吸器内科学)¹⁾、山形大学人体病理学²⁾

04 肺サーファクタントおよび肺胞Ⅱ型細胞と緑膿菌 quorum sensing 機構との相互作用

○山田友紀¹⁾、小笠原理恵¹⁾、諏訪部章¹⁾、館田一博²⁾

岩手医科大学医学部臨床検査講座¹⁾、東邦大学医学部微生物・感染症学講座²⁾

11:05～11:15

コーヒーブレイク

11:15～12:00

一般演題3

座長：長内和弘（金沢医科大学）

05 Human Pulmonary Surfactant Protein D Binds to MD-2

○Xiaomeng Nie, Chiaki Nishitani-Ono, Masami Yamazoe, Takeyuki Shimizu, Hiroaki Mitsuzawa, Kaku Sawada, Motoko Takahashi, Hiroki Takahashi and Yoshio Kuroki

06 間質性肺炎の SP-D 光顕免疫染色

○樋田寿々子、安田寛基

帝京大学医学部病理学講座

07 間質性肺炎に対する Cyclosporin A 使用例の検討 —治療有効性と血清マーカー SP-A、SP-D、KL-6—

○大塚満雄、白鳥正典、北田順也、中村直人、工藤和実、村上聖司、千葉弘文、高橋弘毅

札幌医科大学医学部内科学第三講座

12:00～13:15

ランチオンセミナー・教育講演

日本肺サーファクタント界面医学会・エーザイ(株)共催
座長：黒木由夫(札幌医科大学)

「分子物理から見た界面計測」

東京大学生産技術研究所基礎系部門 准教授 酒井啓司 先生

13:15～13:45

総会

13:45～14:30

会長講演

座長：阿部庄作(札幌医科大学名誉教授)

「基礎臨床連携の重要性 —肺サーファクタント研究の軌跡に学ぶ—」

札幌医科大学医学部内科学第三講座 教授 高橋弘毅 先生

14:30～15:30

特別講演 1

座長：諏訪部 章(岩手医科大学)

「デフェンシンと肺の感染防御、炎症、線維化」

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染免疫学講座 准教授 迎 寛 先生

15:30～15:45

コーヒーブレイク

15:45～16:45

特別講演2

座長：高橋弘毅（札幌医科大学）

「肺コレクチン（SP-A・SP-D）による自然免疫の分子機構」

札幌医科大学医学部生化学第一講座 教授 黒木由夫 先生

16:45～16:50

次期会長の挨拶

第44回日本肺サーファクタント・界面医学会学術研究会会長
松村豪一（聖学院大学）

抄 録

会 長 講 演

特 別 講 演

ランチョンセミナー・教育講演

一 般 演 題

基礎臨床連携の重要性 —肺サーファクタント研究の軌跡に学ぶ—

高橋 弘毅

札幌医科大学医学部内科学第三講座

私が肺サーファクタント研究に足を踏み入れたのは、かれこれ23年前になる。生化学第一講座（秋野豊明教授）で基礎研究をさせていただいたのがその発端である。1984年当時、新生児／周産期の分野では、新生児呼吸窮迫症候群の病態解明のために肺サーファクタント研究が活発に行われ、岩手医大小児科（藤原哲郎教授）を中心に治療薬としての人工サーファクタントの開発が進行中であった。実験技術の習得を兼ねて、先ずはリン脂質分析を始めた私が最初に思ったこと、この研究が果たして臨床の役に立つのであろうかという素朴な疑問であった。また、臨床医として私が専攻した呼吸器内科学においては、肺サーファクタント研究に携わる研究者は極めて少なく、日の当たらぬ関心薄き分野であるとも感じた。

その頃は肺サーファクタント特異蛋白質の研究が始まって間もない時代でもあった。同講座では黒木由夫助手らが着手したモノクローナル抗体の作製に力を注いでいて、私もこのプロジェクトに加わった。その後、研究は「羊水迅速診断キットの開発」の形で結実した。基礎研究が臨床応用される事例を初めて目にすることができた。一方、内科学第三講座の中村光成講師が中心となって腺癌組織の脂質分析をしていた。そのなかで原発性肺癌は転移性肺癌に比し肺サーファクタントに近いリン脂質組成を有することを明らかにした。このことがヒントになり、同じく肺サーファクタント成分である SP-A が肺癌の免疫組織学的マーカーとして臨床応用されるに至った。これが、基礎臨床連携の重要性を肌で感じた2回目であった。

2年半の基礎研究を修了し、内科学第三講座（鈴木明教授）に帰ってからは本

デフェンシンと肺の感染防御、炎症、線維化

迎 寛

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座 (第二内科)

肺は外気に曝露されているため、病原微生物の定着や侵入が絶えず行われている。そのため肺においては気道粘液(液性因子)を中心とした自然免疫が発達している。その中で surfactant protein A や D とならんでデフェンシンなどの抗菌ペプチドが現在注目されている。デフェンシンは幅広い抗菌活性を持つ塩基性のペプチドであり、ヒトでは α と β 型の2種類に分類される。ヒトでは α 型が6、 β 型は遺伝子解析を含め約20種類以上が知られているが、 α は主に好中球を中心とした、また β は上皮細胞を中心とした抗菌作用をそれぞれ担っている。われわれは α デフェンシンに属する human neutrophil peptide (HNP) 1 と β デフェンシン 1, 2, 3, 4 を合成し、ウサギに免疫することで得られた抗血清を用いてそれぞれの radioimmunoassay (RIA) を開発し、検討を加えてきた。まず作製したそれぞれの合成ペプチドの抗菌活性を検討したが、大腸菌などに対する抗菌活性はデフェンシンの種類により差がみられたが、各菌種に対して明らかな抗菌作用を認めた。RIA による検討では、肺炎などの呼吸器感染症患者の血漿、気管支肺胞洗浄液においては α デフェンシンと β デフェンシン 1 が一番多く存在し、 α デフェンシン、 β デフェンシン 2, 3 は、急性期に高値となり、回復期には正常化した。これらの結果から、 β デフェンシン 1 は侵入してきた病原微生物に対して速やかに作用するために恒常的に発現し、 β 2 や 3 は感染が生じた後に上皮細胞が産生していることが推測される。デフェンシンには抗菌活性以外にも樹状細胞や T 細胞の遊走活性をもつなど様々な作用が知られている。われわれの検討では HNP1 で気道上皮細胞を刺激すると IL-8 の mRNA や蛋白発現の亢進がみ

肺コレクチン (SP-A・SP-D) による 自然免疫の分子機構

黒木 由夫

札幌医科大学医学部生化学第一講座

肺コレクチンのサーファクタント蛋白質 A と D (SP-A と SP-D) は、マンノース結合コレクチンとともに、C 型コレクチンのコレクチン・グループに属する。SP-A と SP-D は、疎水性の SP-B と SP-C、および、特異リン脂質とともに、肺サーファクタントを構成する成分で、肺の生体防御を担っている。呼吸器は外界に開放しており、常に病原微生物侵入の危険に曝されているので、肺コレクチンによる自然免疫機構は重要である。

SP-A ノックアウトマウスでは、smooth LPS の気管内投与によって肺内炎症反応が有意に亢進する。SP-A は、ペプチドグリカン、ザイモサンおよび smooth LPS に結合しないが、これらのリガンドにより惹起される炎症性サイトカイン分泌と NF- κ B 活性化を有意に抑制した。さらに、SP-A は、Toll 様受容体 (TLR) 2 と 4 の細胞外ドメインに結合し、SP-A 存在下では、TLR 細胞外ドメインと上記リガンドとの結合が有意に抑制された。このことは、SP-A が TLR 細胞外ドメインに結合することによって、TLR-リガンド相互作用が阻害され、TLR 介在炎症反応が抑制されることを示唆している。

コレクチンは、細菌に直接結合し、オプソニンとしてマクロファージによる細菌貪食を促進することが知られている。一方では、肺コレクチンは細菌に結合できない条件下でも細菌貪食を促進することが示され、オプソニン効果の他にもマクロファージによる細菌貪食促進の機構が存在することが明らかにされた。肺コレクチン存在下では、マクロファージにおけるスカベンジャー受容体 A やマンノース受容体の貪食受容体の細胞膜局在が有意に増加することが示され、そのこ

分子物理から見た界面計測

酒井 啓司

東京大学生産技術研究所基礎系部門 准教授

液晶やゲル、ミセルや分子膜など分子集合体が形成する生体系などの複雑流体は、自己組織化的に高度に秩序化された内部構造を形成します。これらの物質群はソフトマテリアルとも呼称されるように、温度や電場・磁場などの外的刺激に応じて容易にその構造を変化させ、さまざまな機能を発現ことが知られています。このため近年では、これらの性質を新しいマイクロデバイス材料へと応用しようとする試みが盛んに進められています。同時にこれらの材料群は、生体の特徴付けるラメラ、リボソーム、ミエリンなどの生体構造の基本要素を構成することでも重要な存在です。

ソフトマテリアルを素材とするデバイス形成プロセスでは、流体材料が分子レベルまで分割可能であるという特質が最大限に利用されます。具体的には従来のスピコートやオフセットプリンティングに加え、近年大きく発展しているインクジェット技術など、原理が比較的単純な過程によってナノメートルの厚みの薄膜や、サブピコリットル体積のドットパターンを任意の空間配置に迅速に形づくることが可能となっています。このように流体を用いた加工プロセス技術は大きく発展しておりますが、しかし一方で、薄膜や微小液滴という特殊形状において、また実際のインクジェットや印刷プロセスに対応する超高速変形下において、材料である流体の真の粘弾性や表面張力を測定する手法はまったくといっていいほど存在しません。

研究会では、これら極限環境下にあるソフト材料群の、とりわけ表面近傍の物性を計測するために開発された新しいプローブを紹介するとともに、これらの新

ウランの代わりにウーロン茶抽出物 (OTE) を用いた電子染色法 —II型肺胞上皮細胞の観察

○佐藤 茂、安達彰子、佐佐木喜広

日本医科大学 中央電子顕微鏡研究施設

【はじめに】透過型電子顕微鏡 (TEM) の電子染色は酢酸ウランとクエン酸鉛の二重染色が50年余使われ続けている。しかしながら、酢酸ウランは放射性物質であることから購入、保管、廃棄などその扱いは煩雑である。その上、酢酸ウランは国際規制物質であり外国から日本への輸入は困難となっている。電子顕微鏡を扱ういくつかの施設では酢酸ウランが無くなって来ているのが現状である。そこで、ウランの代用としてタンニン酸や白金ブルーが候補にあげられている。しかしながら、タンニン酸はウランと鉛の二重染色と比較して微細構造が明瞭でない。また、白金ブルーは染色液の作製が煩雑である。そこで、タンニン酸と同じポリフェノールである OTE (oolong tea extract) がウランの代用として電子染色出来るかを検討した。

また、電顕フィルムは4~6年後には生産されなくなるといわれている。その為、(株)日立製作所や(株)日本電子ではフィルムを用いないデジタル TEM が発売されている。このデジタル TEM にも OTE による電子染色が使えないか二重染色と比較検討した。

【材料および方法】正常ラット肺を2.5% グルタルアルデヒドおよび1% 四酸化オスミウム固定し、常法に従って Epok812樹脂にて包埋した。この試料を連続切片として、酢酸ウランとクエン酸鉛の二重染色と OTE 染色法を用いた。OTE 染色法は0.2%OTE (リン酸緩衝液) 30 - 40分、クエン酸鉛3分である。使用した透過型電子顕微鏡は H-7500型で、CCD カメラはオプションとして付いている。

【結果】II型肺胞上皮細胞をアナログ観察すると、ウランと鉛の二重染色と OTE 染色法はほぼ同様な超微形態を示した。また、CCD カメラによるデジタル観察では、二重染色は単位膜が不明瞭であるが OTE 染色法は単位膜構造が明瞭に観察された。

○松村豪一¹⁾、椎橋孝太郎¹⁾、森元貴子¹⁾、佐藤 茂²⁾、永田元春³⁾、
高橋常男⁴⁾、上田真太郎⁵⁾

聖学院大学人間福祉学部¹⁾、日本医科大学中央電子顕微鏡研究施設²⁾、
サンショウウオ研究所³⁾、神奈川歯科大学口腔解剖学⁴⁾、
上田老人医学研究所⁵⁾

【はじめに】

著者らは、これまでにメキシコサンショウウオ、カスミサンショウウオ、クロサンショウウオ、イモリなど両生類呼吸器の発生学的ならびに形態学的研究を実施し報告してきた。今回は肺魚の気道と肺胞上皮細胞について検索した結果を報告する。

【方法】

南米産の肺魚、レピドシレン パラドクサの成体3匹、アフリカ産の肺魚プロトプテルス アネクテンスの成体2匹を使用した。開胸および開腹後、胃、食道や十二指腸等の消化器および肝臓を摘出して、それらの背後に存在する肺嚢を観察しやすくした。ついで縦に細長い肺嚢を気管に接続している気道部、尾に近接している肺胞上皮部、とそれらの中間部の3箇所に分けて摘出し、光顕用には10%フォルムアルデヒド固定液で固定し、電顕用には2.5%グルタルアルデヒド固定液で固定し、以下通常のSEM用及びTEM用電顕試料を作成し、検鏡した。

【結果】

走査電顕で観察すると、肺嚢の気道部分は肺嚢の隔壁と襞の部分に多く見られ、線毛で覆われ、ところどころに、円形の粘液細胞が存在した。これら隔壁の中央陥凹部に肺上皮が存在していた。透過電顕では、気道を構成する線毛上皮細胞と粘液産生細胞が観察された。肺胞上皮には、肺胞上皮細胞の細胞質と毛細血管内皮とそれらの間にある基底膜から構成される空気血液関門が明瞭に存在した。また、円形細胞の細胞質には封入層板小体(好オスミウム小体)が認められ、これらの肺魚の肺内腔に肺界面活性物質の存在する事が強く示唆された。

【結論】

肺魚レピドシレン パラドクサおよびプロトプテルス アネクテンス成体の肺嚢を形態学的に観察し、気道では線毛運動および粘液を産生する機能を有し、肺

Rab38欠損ラット由来初代培養肺胞II型上皮細胞におけるフォスファチジルコリンの分泌活性

○長内和弘¹⁾、小林 誠¹⁾、八田理恵子¹⁾、三輪知子¹⁾、土原一真¹⁾、
井口晶晴¹⁾、黄正寿¹⁾、梅博久¹⁾、樋口純子²⁾
金沢医科大学呼吸機能治療学(呼吸器内科学)¹⁾、山形大学人体病理学²⁾

【背景】

Rab38は細胞内小胞輸送を制御するRab低分子量Gタンパク質の一員であり、同タンパク質を欠損するFown-Hooded、Tester-Moriyama、Long Evans Cinnamon/Crj(LEC)などは、ヘルマンスキー・パドラック症候群(HPS)のモデル動物とみなされ、Rab38はHPSの候補遺伝子にあげられている。我々は前回の本学会において、LECは気腫性肺病変を示すこと、透過型電顕による観察で、肺胞II型上皮細胞内には大型の層状封入体が多数みられること、肺サーファクタン成分が全肺組織中や層状封入体画分では増加し、肺胞洗浄液中では減少していることを示した。これらの結果よりRab38の欠損により肺サーファクタントの分泌障害が起き、層状封入体が細胞内に蓄積し、気腫性肺病変が起きると推定された。

【目的】

Rab38欠損肺胞II型上皮細胞において肺サーファクタントの主成分であるフォスファチジルコリンの分泌が抑制されているかどうか検討する。

【方法】

Rab38欠損ラットとして雄8-10週令LECラットを、コントロールとして同令の雄Sprague-Dawley(SD)またはBrown Norway(BN)を用いた。エラスターゼ消化、メトリザマイド密度勾配遠心法にて肺胞II型上皮細胞を単離し、[3H]塩化コリンとともに20時間、プラスチック培養皿上に培養した。基礎分泌およびアゴニスト刺激分泌を観察した。

【結果】

基礎分泌はコントロールラットに比べてLECラットはわずかだが有意に低下していた。ところが、フォルボールエステル、ATP、テルブタリンによる刺激ではいずれにおいてもLECラットでは著明な分泌亢進を示した。SP-Aは基礎

肺サーファクタントおよび肺胞Ⅱ型細胞と緑膿菌 quorum sensing 機構との相互作用

○山田友紀¹⁾、小笠原理恵¹⁾、諏訪部章¹⁾、館田一博²⁾

岩手医科大学医学部臨床検査講座¹⁾、東邦大学医学部微生物・感染症学講座²⁾

【はじめに】

細菌の産生する autoinducer を介して病原因子産生を制御する quorum sensing (QS) 機構が注目されている。緑膿菌の慢性感染症に QS 機構の関与が明らかとなり、その抑制機序の解明は新しい治療法の開発につながるとして期待されている。今回、肺サーファクタントおよび肺胞Ⅱ型細胞と緑膿菌 QS 機構との相互作用を検討した。

【方法】

ラット肺より分離した肺胞Ⅱ型細胞に、緑膿菌の autoinducer である N-3-oxododecanoyl homoserine lactone (C12-HSL) と N-butyryl-L-homoserine lactone (C4-HSL) を作用させた。細胞傷害の評価は、培養上清の LDH 活性を測定した。アポトーシスの評価は、パパニコロー染色を行ない apoptotic body 数をカウントした。次に、人工肺サーファクタント(サーファクテン)の存在下で、緑膿菌のバイオフィームとピオシアニンの産生量を測定した。また、サーファクテンによる作用がリン脂質成分による作用か否かを検討する目的で、dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) と dioleoyl phosphatidylcholine (DOPC) のリポゾームを作製し、同様に実験を行なった。バイオフィームの形態は電子顕微鏡によって確認した。統計学的解析は、one-way ANOVA で群間の比較を行い、 $p < 0.05$ を統計上有意差ありとした。

【結果】

1. HSL による肺胞Ⅱ型細胞の変化

培養上清の LDH 活性は C12-HSL の濃度依存性に高値を示した。C4-HSL 処理細胞の LDH 活性に変化は認められなかった。apoptotic body 数は、C12-HSL 処理細胞において濃度依存性に増加し、C4-HSL 処理細胞では有意差は認められなかった。

Human Pulmonary Surfactant Protein D Binds to MD-2

○ Xiaomeng Nie, Chiaki Nishitani-Ono, Masami Yamazoe, Takeyuki Shimizu, Hiroaki Mitsuzawa, Kaku Sawada, Motoko Takahashi, Hiroki Takahashi and Yoshio Kuroki

Pulmonary surfactant protein D (SP-D), a member of the collectin family, plays important roles in innate immunity of the lung. MD-2 is critical for Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated responses to lipopolysaccharide (LPS). We have previously shown that SP-A, a homologous collectin, interacts with TLR4 and MD-2 via its carbohydrate recognition domain (CRD), and modulates TLR4/MD-2-mediated cell responses (Yamada C, et al. *J Biol Chem*, 2006; 281:21771-21780). In addition, we have also reported that SP-D binds to the extracellular domain of TLR4 through the CRD (Ohya M, et al. *Biochemistry*, 2006; 45: 8657-8664). The purpose of this study was to determine whether SP-D interacts with MD-2. Recombinant soluble form of MD-2 (sMD-2) was produced by a baculovirus-insect cell expression system. Recombinant human SP-D (rSP-D) bound to MD-2 coated onto microtiter wells in a concentration-dependent manner in the presence of Ca²⁺. When rSP-D and sMD-2 were coinubated and sMD-2 was immunoprecipitated, rSP-D was co-precipitated. Similarly, when biotinylated rSP-D was pulled down by streptavidin-agarose, sMD-2 was co-sedimented. Inclusion of 5 mM EDTA or 0.2 M mannose in the binding buffer reduced the binding of rSP-D to sMD-2 by approximately 70-80%. Anti-SP-D monoclonal antibodies 7A10 and 7C6 whose epitopes lie in the CRD and neck, respectively, were used to determine the roles of the SP-D domains in the sMD-2 binding. 7A10 but not 7C6 significantly inhibited the rSP-D binding to sMD-2, indicating the involvement of the CRD in the sMD-2 binding. These results clearly demonstrate for the first time that SP-D binds to MD-2 through its CRD.

A series of horizontal dotted lines for writing.

○樋田寿々子、安田寛基

帝京大学医学部病理学講座

【はじめに】

間質性肺炎 (UI) はその原因や病態からいくつかの分類があるが、共通する病理像として、肺胞間質を主体とした瀰漫性で高度の炎症の広がり と線維化が指摘されている。そして、病因として、最近、肺サーファクタント、殊に SP-D に対する IgG 関与の自己免疫が注目されている。そのため、今回、UI 症例の剖材肺で SP-D の光顕免疫染色による形態学的観察を実施し、更に、IgG との関連を試行した。

【方法】

症例；UI の剖検例の肺 16 例 (主として IIP, 内 PSS 3 例、RA 3 例、60～70 歳)、
対照 8 例 (著変のない肺、他)

方法；1) ホルマリン固定パラフィン切片による光顕免疫染色。抗体；SP-D (mouse monoclonal, Abcom 社及び一部で rabbit polyclonal, Santa cruze 社)、SP-A (mouse monoclonal, DAKO 社)、IgG (rabbit polyclonal, DAKO 社)、染色キット (ヒストファインシンプルステイン MAX-PO、ニチレイ社)。2) 1) と同様の方法による IgG と SP-D の 2 重反応で SP-D のみ発色；IgG (rabbit polyclonal) 反応後、水洗、SP-D (mouse monoclonal) を反応させ、マウス 2 次抗体で反応、DAB 発色 (SP-D のみ発色)。同様に IgG と SP-A、対照として IgG と PBS (陰性対照)。

【結果と考察】

- 1) SP-D 光顕免疫染色；UI で、肺胞のマッソン体 (又は肺胞内線維化部)、肺胞壁・間質に斑状の陽性部を伴い、その他の肺胞上皮等は陽性の低下傾向があり、一部に全体に染色性の悪いものも見られた。全体に浸潤リンパ球は一部陽性。
- 2) IgG 光顕免疫染色；UI の 1) の部位および壊死部を含む II 型肺胞上皮に強陽性。浸潤リンパ球は一部陽性。

間質性肺炎に対する Cyclosporin A 使用例の検討 —治療有効性と血清マーカー SP-A、SP-D、KL-6—

○大塚満雄、白鳥正典、北田順也、中村直人、工藤和実、村上聖司、
千葉弘文、高橋弘毅
札幌医科大学医学部内科学第三講座

【背景】 特発性間質性肺炎 (IIPs) に対する治療として、副腎皮質ステロイド薬 (corticosteroid、以下 CS) 単独での有効性は明らかでなく、また、その副作用を軽減する観点からも、現時点では PSL と cyclophosphamide あるいは azathioprine との併用療法の可能性が2000年の米国胸部疾患学会と欧州呼吸器学会の International Consensus Statement で示されている。近年、IIPs に対する CS と免疫抑制薬である Cyclosporin A (CyA) の併用が有効であった症例が存在することや CS 抵抗性の症例に対する有用性が報告されている。

【目的】 間質性肺炎に対して CyA を用いて治療を行った症例における有効性と血清マーカーである SP-A、SP-D、KL-6 の変化を retrospective に検討した。

【方法】 対象は2003年4月から2006年12月まで、札幌医科大学附属病院で CyA を使用した間質性肺炎症例16例で、内訳は特発性肺線維症 (IPF) 6例、非特異型間質性肺炎 (NSIP) 5例、膠原病肺 (CVD-IP) 5例であった。全例、CS を併用した。治療の有効性の検討は、ステロイドパルス療法を行っていない8例を対象に HRCT 所見の変化を検討した。CyA 投与前および投与後の SP-A、SP-D、KL-6 の変化を有効例と無効例で比較検討した。

【結果】 CyA 投与開始の背景は、CVD-IP では CS 減量時の追加例が多かったが、IIPs では低用量の CS と併用した初回治療例が多かった。副作用として肝機能障害が2例に認められ投与中止となった。CyA 投与後に HRCT 所見が改善した症例が CVD-IP で多かったのに対して、IPF では悪化した例が多かった。CyA 投与前後で、CT 所見が改善した群では SP-A、SP-D が有意に低下したのに対して、CT 所見が悪化した群では KL-6 が有意に増加した。

【考察】 CyA 治療にも関わらず IPF 症例で悪化例が多かった理由として、CVD-IP 症例の多くが CS の減量過程に CyA が加えられたのに対して、IPF 症例の多くが低用量 CS とともに初回治療として CyA が開始されていた背景があり、

日本肺サーファクタント・界面医学会
第43回学術研究会プログラム・抄録集

会 期：平成19年10月13日(土)

会 場：札幌医科大学記念ホール

会 長：高橋 弘毅

発行所：〒060-8543 札幌市中央区南1条西16丁目
札幌医科大学医学部内科学第三講座内
TEL(011)611-2111・FAX(011)613-1543

印 刷：Next COMPANY **Secand** 株式会社セカンド
〒862-0950 熊本市水前寺4-39-11 ヤマウチビル1F
TEL096-382-7793 FAX096-386-2025